



蚯蚓提取物对家蚕中肠氧化损伤、总抗氧化能力及抗氧化酶含量的影响

徐麒麟¹, 齐桂兰¹, 蒋易龙², 倪奎³, 陈亚迎¹, 刘瀚扬¹,
朱佳文¹, 吴永胜^{1,*}

(1. 成都市农林科学院畜牧研究所, 成都 611130; 2. 四川农业大学动物科技学院, 成都 611130;
3. 乐至县蚕桑局, 四川乐至 641500)

摘要:【目的】研究蚯蚓提取物对家蚕 *Bombyx mori* 中肠组织氧化应激及抗氧化酶含量的影响, 探究蚯蚓提取物的抗氧化功能。【方法】分别给家蚕 5 龄幼虫饲喂蚯蚓(赤子爱胜蚓 *Eisenia foetida*) 提取液原液的 50, 100 和 200 倍稀释液处理后的桑叶, 测定处理 6 d 后家蚕中肠组织中氧化损伤产物丙二醛(MDA)和乳酸脱氢酶(LDH)的含量; 利用 qRT-PCR 检测家蚕中肠组织中抗氧化酶关键基因(*Cat*, *Sod* 和 *GSH-Px*)的 mRNA 表达水平; 同时采用 ELISA 法检测中肠组织中抗氧化酶[过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(*GSH-Px*)]含量及总抗氧化能力(T-AOC)。【结果】与对照组相比, 50, 100 和 200 倍稀释组家蚕中肠组织中 MDA, CAT, SOD 和 *GSH-Px* 含量及 T-AOC 均差异不显著, 200 倍稀释组 LDH 含量显著降低了 9.85%, 100 倍稀释组中肠中 *Cat* 和 *GSH-Px* 的表达量均显著高于对照组, 3 个稀释组中 *Sod* 的表达量均显著高于对照组。【结论】添食蚯蚓提取物可通过降低家蚕中肠 LDH 含量、提高抗氧化酶基因的表达水平进而提高家蚕的抗氧化能力。

关键词: 家蚕; 赤子爱胜蚓; 蚯蚓提取物; 氧化应激; 抗氧化酶; 乳酸脱氢酶; 总抗氧化能力
中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2020)03-0278-07

Effects of earthworm extract on the oxidative damage, total antioxidant capacity and antioxidant enzyme contents in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*

XU Qi-Lin¹, QI Gui-Lan¹, JIANG Yi-Long², NI Kui³, CHEN Ya-Ying¹, LIU Han-Yang¹, ZHU Jia-Wen¹, WU Yong-Sheng^{1,*} (1. Institute of Animal Science, Chengdu Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Chengdu 611130, China; 2. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 3. Sericultural Bureau of Lezhi, Lezhi, Sichuan 641500, China)

Abstract: 【Aim】To study the effect of earthworm extract on the oxidative stress and antioxidant enzyme contents in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, so as to explore the antioxidant function of earthworm extract. 【Methods】The 5th instar larvae of *B. mori* were fed with mulberry leaves treated with the 50-, 100- and 200-fold dilutions of the original earthworm (*Eisenia foetida*) extract solution, respectively, the contents of malondialdehyde (MDA) and lactate dehydrogenase (LDH) as the products of oxidative damage in the midgut of the larvae treated for 6 d were determined, the expression levels of

key antioxidant enzyme genes *Cat*, *Sod* and *GSH-Px* were assessed by quantitative real-time PCR, and the contents of antioxidant enzymes including catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and the total antioxidant capacity (T-AOC) were detected by enzyme linked-immunosorbent assay. 【Results】The contents of MDA, CAT, SOD and GSH-Px and the T-AOC in the 50-, 100- and 200-fold dilution treatment groups showed no significant difference from those in the control group, and the LDH content in the 200-fold dilution treatment group was significantly decreased by 9.85% as compared to that in the control group. The expression levels of *Cat* and *GSH-Px* in the 100-fold dilution treatment group was significantly higher than those in the control group. The expression levels of *Sod* in the three dilution treatment groups were significantly higher than that in the control group. 【Conclusion】Dietary earthworm extract can improve the antioxidant capacity in *B. mori* by reducing the LDH content and increasing the expression level of antioxidant enzyme genes.

Key words: *Bombyx mori*; *Eisenia foetida*; earthworm extract; oxidative stress; antioxidant enzymes; lactate dehydrogenase; total antioxidant capacity

家蚕 *Bombyx mori* 作为鳞翅目 (Lepidoptera) 昆虫的代表,是仅次于果蝇的模式昆虫,具有繁殖率高、遗传资源丰富、遗传背景清楚等优点,是遗传学、细胞生物学、基因组学研究不可多得的宝贵资源 (贾漫丽等, 2018; 李娜等, 2018)。与哺乳动物不同,昆虫缺乏复杂的免疫球蛋白,而是通过体液免疫和细胞免疫抵御外源病原微生物侵染,体液免疫应答主要包括产生抗菌肽、溶菌酶和黑化反应,细胞免疫应答包括吞噬作用、结节形成和包囊作用等过程 (唐芬芬等, 2017)。在病原体侵染或外界环境变化的条件下,生物体活性氧代谢容易失衡,过多的活性氧易造成氧化应激并最终诱导细胞凋亡。家蚕在长期的进化过程中,为避免氧化损伤,形成了一整套高效的抗氧化酶防御系统以维持机体的氧化还原平衡,包括过氧化氢酶 (catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 等 (袁红霞等, 2014)。

蚯蚓,俗称地龙,由于其丰富的营养成分和显著的临床疾病治疗效果在传统中医中广泛应用。近些年,蚯蚓及其提取物越来越受到关注,蚯蚓提取液富含多种氨基酸、蚓激酶、活性抗菌肽等功效成分,具有促生长、解热、镇痛、抗炎、抑菌、抗衰老和抗癌等多种功效 (Omar *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2018)。本实验室前期研究发现饮水中添加稀释 300 倍的蚯蚓提取液可以提高伊莎学佛黑鸡育成期的体液免疫水平 (李娟等, 2018),饲料中添加蚯蚓提取物 (earthworm extract, EE) 可以降低乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 水平进而提高成华猪的抗氧化能力 (徐麒麟等, 2019)。饲料中添

加蚯蚓提取物可以提高小鼠血清中超氧化物歧化酶活性和总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) (刘瀚扬等, 2019)。覃明和等 (1988) 研究发现,蚯蚓提取物可促进家蚕生长,缩短家蚕发育龄期,提高蚕茧和蚕丝质量,提高产卵量。然而目前尚未见蚯蚓提取物对家蚕抗氧化酶活性的影响研究报道。因此,本实验探究蚯蚓提取液对家蚕中肠氧化损伤、总抗氧化能力、抗氧化酶含量的影响,旨在筛选最适蚯蚓提取液的稀释比例,并验证其生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 家蚕和蚯蚓提取液:供试家蚕品种西昌 871 × 872,由四川省乐至县蚕桑局提供,新鲜桑叶常规饲养。实验用蚯蚓提取液原液由成都市农林科学院畜牧研究所研制,蚯蚓为人工饲养的赤子爱胜蚓 *Eisenia foetida*,蚯蚓提取液用蒸馏水混匀,经自融水解后制备,经检测分析,所制备的蚯蚓提取液原液密度 1.048 g/mL,其中氨基酸总量 (17 种) 5.42%、游离氨基酸 2.97%、SOD 酶 1.23 IU/mg、小肽 6.95% (刘瀚扬等, 2019; 徐麒麟等, 2019)。

1.1.2 主要试剂:家蚕丙二醛、乳酸脱氢酶、总抗氧化能力、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶 ELISA 试剂盒购自北京奇松生物科技有限公司,动物组织总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司,反转录及荧光定量 PCR 试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.1.3 主要仪器:高速冷冻离心机 (Eppendorf)、酶标仪 (Thermo Fisher Multiskan)、荧光定量 PCR 仪

(Bio-Rad)。

1.2 蚯蚓提取液稀释及家蚕添食处理

本实验设计 3 个蚯蚓提取液稀释比例组 EE1, EE2 和 EE3, 原液稀释比例分别为 50, 100 和 200 倍, 蚯蚓提取液用蒸馏水稀释。使用时按 50 mL/kg 比例喷洒新鲜桑叶, 对照组 (CK) 则采用蒸馏水替代。

家蚕幼虫在室内温度 25 ± 1℃、相对湿度 (RH) 75% 的条件下采用新鲜桑叶 (川南饲用桑) 饲喂至 5 龄, 选取发育整齐的 5 龄幼虫 600 头, 随机分为 4 组 (每组 3 个重复, 每个重复区 50 头家蚕)。按 50 mL/kg 比例喷洒新鲜桑叶, 稍晾干后给家蚕添食, 对照组则用蒸馏水替代。每天添食 3 次 (分别在 6:00, 13:00 和 20:00 时), 每区每次添食 100 g 桑叶, 添食前将未食用完的桑叶清理干净, 连续处理 6 d, 第 7 天随机选取 10 头家蚕, 迅速解剖获取中肠, 并置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.3 氧化损伤及抗氧化指标检测

将 1.2 节中所获取的中肠组织用预冷的 PBS 缓冲液匀浆后 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于氧化损伤及抗氧化指标检测。按照试剂盒说明书操作检测中肠组织丙二醛、乳酸脱氢酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶含量和总抗氧化能力。

设置标准品孔和样品孔, 标准品孔加入不同浓度的标准品 50 μL, 样品孔先加入待测样品 10 μL, 再加入 40 μL 样品稀释液, 标准品孔和样品孔加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗体 100 μL, 用封板膜封住反应孔后 37℃ 恒温箱孵育 60 min。孵育完成后弃掉液体, 加入洗涤液洗涤后每孔加入底物 A, B 各 50 μL, 37℃ 避光孵育 15 min, 孵育完成后每孔加入 50 μL 的终止液, 15 min 内检测各孔的 OD₄₅₀ 值。根据标准样品的 OD₄₅₀ 构建标准曲线, 通过样品

的 OD₄₅₀ 值计算待测样品相关指标的含量。

1.4 总 RNA 提取与反转录

按照天根动物组织总 RNA 提取试剂盒操作说明书提取 1.2 节所采集的家蚕幼虫中肠组织总 RNA。参照反转录试剂盒说明书将组织总 RNA 反转录成 cDNA 模板。反应体系 (20 μL): 9.0 μL RNase Free dH₂O, 1.0 μL Oligo dT Primer, 1.0 μL Random 6 mers, 4.0 μL 5 × PrimeScript Buffer, 1.0 μL PrimeScript RT Enzyme Mix I 和 4.0 μL 中肠组织总 RNA。反应条件: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 5 min, 反应完成后将 cDNA 模板置于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.5 实时荧光定量 PCR

根据 NCBI 数据库中家蚕抗氧化酶基因 *Cat* (GenBank 登录号: NM_001043447.1)、*Sod* (GenBank 登录号: NM_001043619.1) 和 *GSH-Px* (GenBank 登录号: NM_001046639.1) 编码区序列, 采用 Primer Premier 6 和 Oligo 7 软件设计定量引物并委托北京六合华大基因科技股份有限公司合成, 引物信息如下表 1 所示。

荧光定量 PCR 采用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒 (TaKaRa, 大连)。以家蚕 *β-actin* (GenBank 登录号: 49644.1) 为内参基因, 采用实时荧光定量 PCR 检测各组中肠组织中抗氧化酶关键基因 *Cat*, *Sod* 和 *GSH-Px* 的相对表达量。反应体系 (20 μL): SYBR Green 10.0 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, cDNA 模板 1.0 μL, RNase Free dH₂O 8.2 μL。反应条件: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 10 s, 59 (61.4)℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 39 个循环; 95℃ 10 s, 然后以 0.5℃/10 s 的速率从 65℃ 缓慢升温至 95℃, 绘制溶解曲线, 每个样品 3 个重复。

表 1 实验所用引物
Table 1 Primers used in the experiment

基因 Gene	引物序列 (5' - 3') Primer sequences	退火温度 (℃) Annealing temperature	预期产物大小 (bp) Predicted product size
<i>β-actin</i>	F: CTGCGTCTGGACTTGGC	59	184
	R: CGAGGGAGCTGCTGGAT		
<i>Cat</i>	F: TGAATAAACGCAGCAGCATC	59	110
	R: AACTTCTCCCAAGCGACAGC		
<i>Sod</i>	F: GTACAGCAGAACTGGGACCACC	61.4	127
	R: GGCTTGACTAAGGTTAAACACG		
<i>GSH-Px</i>	F: GACGGAAGCGGAACAACG	59	117
	R: AGTGGCAACGCCGTTGGA		

1.6 数据分析

实验数据采用 SAS 9.2 统计分析软件进行统计,结果用平均值 ± 标准差 (means ± SD) 表示,使用 *t* 检验分析显著性, $P < 0.05$ 表示差异显著。荧光定量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理数据,用 β -actin 作为内参基因,以对照组中肠组织中基因表达量为 1,计算 *Cat*, *Sod* 和 *GSH-Px* 基因的相对表达量,所有实验结果均采用 GraphPad Prism6 软件作图。

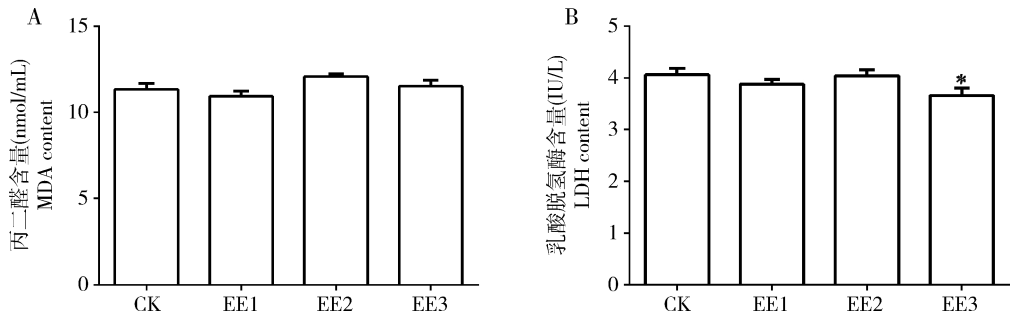


图1 蚯蚓提取液对家蚕5龄幼虫中肠丙二醛(A)和乳酸脱氢酶(B)含量的影响
Fig. 1 Effect of earthworm extract solution on the contents of malondialdehyde (MDA) (A) and lactate dehydrogenase (LDH) (B) in the midgut of the 5th instar larvae of *Bombyx mori*

CK: 对照组(蒸馏水)Control group (distilled water); EE1: 50倍蚯蚓提取液原液稀释组 Treatment group with 50-fold dilution of the original earthworm extract solution; EE2: 100倍蚯蚓提取液原液稀释组 Treatment group with 100-fold dilution of the original earthworm extract solution; EE3: 200倍蚯蚓提取液原液稀释组 Treatment group with 200-fold dilution of the original earthworm extract solution. 图中数据为平均值 ± 标准差 (n=3); 柱上星号表示对照组和蚯蚓提取液处理组间差异显著 ($P < 0.05$, *t* 检验)。Data in the figure are means ± SD (n = 3). Asterisk above bars indicates significant difference between the control group and the earthworm extract solution treatment groups ($P < 0.05$, *t*-test). 下图同 The same for the following figures.

如图1(B)所示,家蚕5龄幼虫食用了蚯蚓提取液稀释液处理的桑叶后,中肠组织氧化损伤产物LDH含量有所下降。其中,200倍蚯蚓提取液原液稀释组中肠组织中LDH含量与对照组相比显著降低了9.85% ($P < 0.05$),而50和100倍稀释组LDH含量与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 蚯蚓提取液对家蚕5龄幼虫中肠总抗氧化能力的影响

总抗氧化能力是由各种抗氧化物质和抗氧化酶构成,其数值的高低与机体清除自由基的能力呈正相关。如图2所示,家蚕5龄幼虫食用了蚯蚓提取液稀释液处理的桑叶后,50,100和200倍蚯蚓提取液原液稀释组中肠组织中总抗氧化能力与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 蚯蚓提取液对家蚕5龄幼虫中肠抗氧化酶基因表达的影响

如图3所示,家蚕5龄幼虫食用了蚯蚓提取液稀释液处理的桑叶后,中肠组织中抗氧化酶关键基因的相对表达量均有上调。其中,100倍蚯蚓提取液原液稀释组中肠中*Cat*和*GSH-Px*的表达量分别是对照组的1.84(图3:A)和1.39倍 ($P < 0.05$)

2 结果

2.1 蚯蚓提取液对家蚕5龄幼虫中肠抗氧化产物丙二醛和乳酸脱氢酶含量的影响

如图1(A)所示,家蚕5龄幼虫食用了蚯蚓提取液稀释液处理的桑叶后,50,100和200倍3个蚯蚓提取液原液稀释组中肠组织氧化损伤产物MDA含量与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。

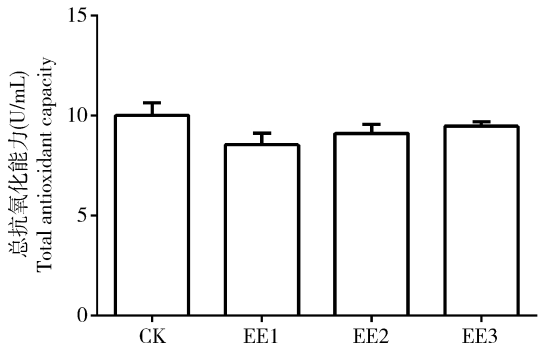


图2 蚯蚓提取液对家蚕5龄幼虫中肠总抗氧化能力的影响
Fig. 2 Effect of earthworm extract solution on the total antioxidant capacity in the midgut of the 5th instar larvae of *Bombyx mori*

(图3:C),50,100和200倍蚯蚓提取液原液稀释组中*Sod*的表达量分别是对照组的1.58,2.06和1.61倍 ($P < 0.05$)(图3:B)。

2.4 蚯蚓提取液对家蚕5龄幼虫中肠抗氧化酶含量的影响

如图4所示,家蚕5龄幼虫食用了蚯蚓提取液稀释液处理的桑叶后,50,100和200倍蚯蚓提取液原液稀释组中肠组织中CAT,SOD和GSH-Px的含

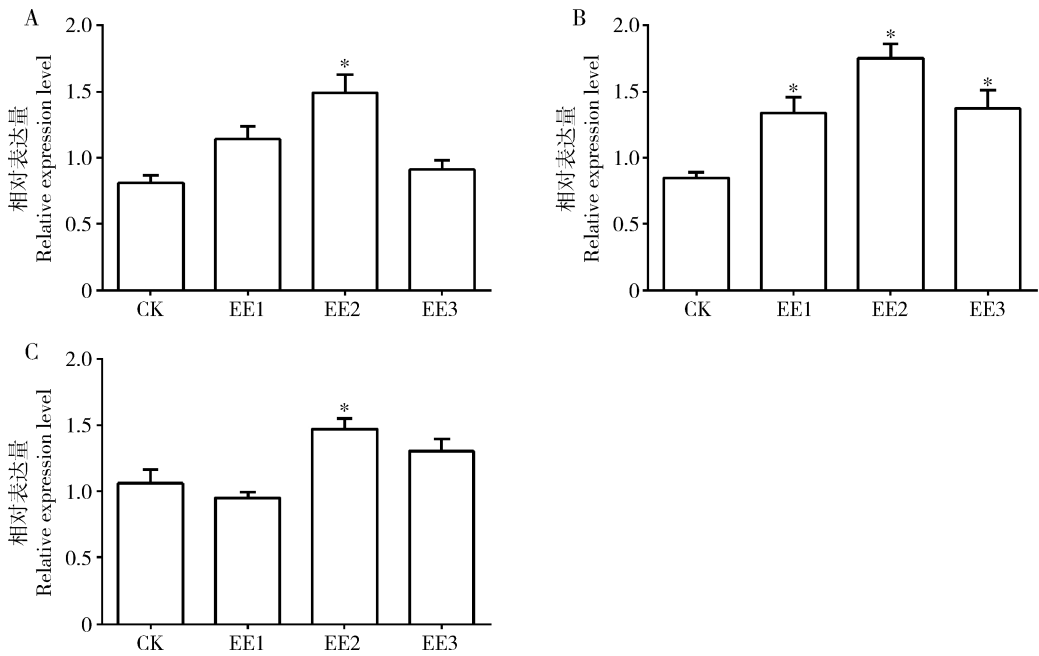


图3 蚯蚓提取液对家蚕5龄幼虫中肠抗氧化酶基因表达的影响
Fig. 3 Effect of earthworm extract solution on the expression of antioxidant enzyme genes in the midgut of the 5th instar larvae of *Bombyx mori*

A: *Cat*; B: *Sod*; C: *GSH-Px*. 以 *actin* 基因为内参. The *actin* gene was used as the internal reference.

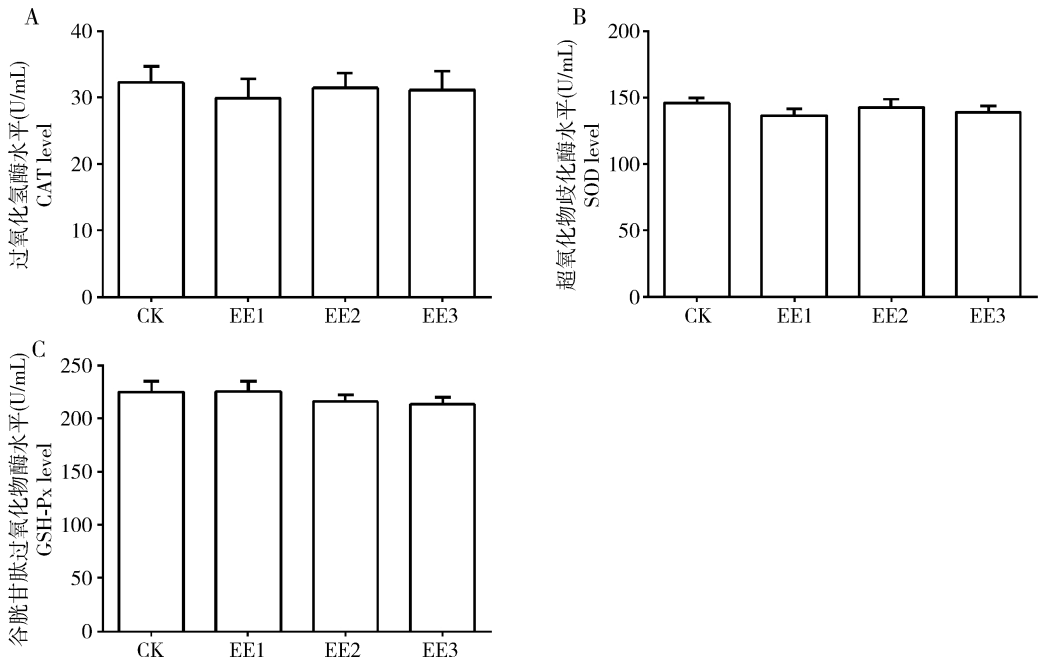


图4 蚯蚓提取液对家蚕5龄幼虫中肠抗氧化酶含量的影响
Fig. 4 Effect of earthworm extract solution on the contents of antioxidant enzyme in the midgut of the 5th instar larvae of *Bombyx mori*

A: 过氧化氢酶 Catalase; B: 超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase; C: 谷胱甘肽过氧化酶 Glutathione peroxidase.

量与对照组相比均没有显著差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

抗氧化防御系统是昆虫抗逆机制的一个重要组

成部分,它能够避免或减轻由外源性污染物或不利条件下导致的氧化损伤,保证机体正常生命活动的进行(刘井兰等, 2006)。蚯蚓提取液富含多种氨基酸、微量元素、抗氧化酶及抗菌肽等活性物质,具有

促生长、抗菌、提高机体抗氧化及免疫功能等作用(谢大识等, 2008)。本实验研究发现, 蚯蚓提取液可降低乳酸脱氢酶含量, 提高抗氧化酶关键基因的表达。

丙二醛含量是膜脂质过氧化终产物, 丙二醛含量间接反应了机体内活性氧自由基水平和细胞的损伤程度(戴金妹等, 2015)。丙二醛含量升高可使生物膜的多不饱和脂肪酸发生氧化反应, 并且通过脂氢过氧化物的分解产物引起细胞损伤, 导致细胞膜构型、结构和通透性改变进而诱导氧化应激(米智等, 2013)。肖龙云等(2010)研究发现, 5 龄幼虫期氟化物中毒家蚕体内氧自由基上升, 脂质过氧化物作用增强, 其表现为氟化物中毒组血淋巴中丙二醛水平比正常组高 83.77%。袁红霞等(2014)研究发现蝼蛄胁迫可造成 5 龄家蚕幼虫脂肪体中丙二醛水平升高并导致其氧化损伤。吴宿慧等(2015)研究发现决明子可以降低家蚕血淋巴中丙二醛水平并提高机体抗氧化能力。周亿金和李文平(2009)研究发现蚯蚓提取液可降低小鼠血液和肝脏中丙二醛水平。而本实验研究发现家蚕食用蚯蚓提取液处理的桑叶后, 中肠组织中丙二醛含量没有显著变化(图 1), 表明在上述剂量下蚯蚓提取液不是通过影响丙二醛的含量进而影响中肠组织脂质氧化损伤。

乳酸脱氢酶是一种细胞质氧化还原酶, 在组织中广泛表达, 主要作用是催化乳酸氧化为丙酮酸, 在三羧酸循环过程中具有重要作用(Sifi and Soltani, 2018), 乳酸脱氢酶是机体病理损伤、炎症反应和氧化应激的标志, 其水平常常用于细胞和组织毒理学领域和临床生物学诊断(Akila *et al.*, 2017)。Deng 等(2019)研究发现, 蚯蚓提取物可以显著降低小鼠肿瘤的大小, 降低乳酸脱氢酶水平并促进肿瘤细胞凋亡。我们前期研究发现饲料中添加蚯蚓提取物可以降低乳酸脱氢酶水平进而提高成华猪的抗氧化能力(徐麒麟等, 2019)。本研究发现, 与对照组相比, 200 倍蚯蚓提取液原液稀释组乳酸脱氢酶含量显著降低了 9.85% ($P < 0.05$) (图 1), 表明上述剂量下蚯蚓提取液可通过降低乳酸脱氢酶含量进而减轻家蚕中肠的脂质损伤。

总抗氧化能力反映了机体清除活性氧的能力。范涛等(2016)研究发现蚯蚓粉替代鱼粉对大鳞副泥鳅总肝胰脏总抗氧化能力没有影响。李荣妮等(2018)研究发现蚯蚓粪对罗非鱼血清中总抗氧化能力也没有影响。我们前期研究发现, 饲料中添加蚯蚓提取物可以提高小鼠血清中总抗氧化能力(刘

瀚扬等, 2019), 而本研究发现蚯蚓提取液处理后家蚕中肠组织中总抗氧化能力没有显著变化(图 2), 这与我们在成华猪上的研究结果(徐麒麟等, 2019)相一致, 表明蚯蚓提取物对动物的总抗氧化能力的影响可能存在种属及组织差异。

蚯蚓提取液中富含丰富的过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶, 越来越多的研究表明蚯蚓提取物可以提高机体抗氧化能力, 其表现为促进抗氧化酶基因的表达和提高抗氧化酶水平。Omar 等(2012)研究发现蚯蚓提取物可以提高过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性及谷胱甘肽含量而发挥抗氧化作用。Prakash 等(2008)研究发现蚯蚓粉可上调大鼠肝脏过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性进而发挥保肝和抗氧化作用。周亿金和李文平(2009)研究发现蚯蚓提取物提高成年小鼠血液和肝脏组织中过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性。本研究发现 100 倍蚯蚓提取液原液稀释组中肠中 *Cat* 和 *GSH-Px* mRNA 表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 3 个稀释组中 *Sod* 的 mRNA 表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 3), 但上述关键抗氧化酶的含量与对照组却没有差异(图 4), 一方面可能是由于检测方法灵敏度的原因, 另一方面, 抗氧化酶转录水平的提高也不一定会造成翻译水平的提高。

本研究结果表明, 家蚕 5 龄幼虫添食蚯蚓提取物的桑叶可降低中肠组织中乳酸脱氢酶含量, 促进过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶基因的表达。

参考文献 (References)

- Akila P, Asaikumar L, Vennila L, 2017. Chlorogenic acid ameliorates isoproterenol-induced myocardial injury in rats by stabilizing mitochondrial and lysosomal enzymes. *Biomed. Pharmacother.*, 85: 582–591.
- Dai JM, Zhang LL, Geng BR, 2016. Effect of methylene dithiocyanate on antioxidant system activity and malondialdehyde content in *Polypedates megacephalus* tadpoles. *Sichuan J. Zool.*, 35(2): 283–287. [戴金妹, 张玲玲, 耿宝荣, 2016. 二硫氰基甲烷对斑腿泛树蛙蝌蚪抗氧化系统及丙二醛含量的影响. *四川动物*, 35(2): 283–287]
- Deng ZH, Gao SS, Xiao X, Yin N, Ma SY, Li WP, Li YS, 2019. The effect of earthworm extract on mice S180 tumor growth and apoptosis. *Biomed. Pharmacother.*, 115: 1–7.
- Fan T, Liu Y, Ming W, Lin RN, Wen AX, 2016. Effects of substituting fishmeal with earthworm (*Eisenia foetida*) meal on growth, muscle composition, serum biochemistry index and immunity performance in the loach *Paramisgurnus dabryanus*. *J. Fish. Sci. China*, 23(6):

- 1320–1331. [范涛, 刘毅, 明伟, 林荣楠, 温安祥, 2016. 蚯蚓粉替代鱼粉对大鳞副泥鳅生长、肌肉成分、血清生化指标及免疫性能的影响. *中国水产科学*, 23(6): 1320–1331]
- Jia ML, Li N, Xie Y, Huang L, Yang GM, Li JS, 2018. Effect of adding melamine to mulberry leaves on the growth and digestive metabolism of silkworms. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 55(2): 243–250. [贾曼丽, 李娜, 谢岩, 黄露, 杨贵明, 李季生, 2018. 桑叶中添加三聚氰胺对家蚕生长及代谢的影响. *应用昆虫学报*, 55(2): 243–250]
- Li J, Qiu SX, Lei CL, Li CY, Xu ZY, Mei XL, Wu YS, 2018. Effect of earthworm extract on production performance and immune function of ISA Schaeffer black chicken. *Heilongjiang Anim. Sci. Veter. Med.*, (8): 145–147. [李娟, 邱时秀, 雷春龙, 李丛艳, 许祯莹, 梅秀丽, 吴永胜, 2018. 蚯蚓提取物对伊莎雪佛黑鸡生产性能及免疫功能的影响. *黑龙江畜牧兽医*, (8): 145–147]
- Li N, Jin HJ, Jia ML, Huang L, Xie Y, Xia AH, Yang GM, Li JS, 2018. Effect of yeast extract powder on triglyceride content and uric acid metabolism in hemolymph of silkworms. *Chin. J. Anim. Nutr.*, 30(6): 2245–2251. [李娜, 靳慧杰, 贾曼丽, 黄露, 谢岩, 夏爱华, 杨贵明, 李季生, 2018. 酵母浸粉对家蚕血淋巴中甘油三酯含量和尿酸代谢的影响. *动物营养学报*, 30(6): 2245–2251]
- Li RN, Tang RB, Zhu LF, Shi DJ, Zhang X, 2018. Effect of dietary earthworm powder and vermicompost on growth performance and serum antioxidant indices in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *J. Dalian Ocean Univ.*, 33(2): 100–105. [李荣妮, 唐瑞波, 朱莉飞, 史东杰, 张欣, 2018. 饲料中添加蚯蚓粉和蚯蚓粪对罗非鱼生长及血清抗氧化指标的影响. *大连海洋大学学报*, 33(2): 100–105]
- Liu HY, Wu YS, Zhu JW, Chen YY, Xu QL, Xu ZY, Yang X, Qiu SX, Qi GL, Li J, Sun YH, Lei CL, 2019. Physiological effect of earthworm extract in mice. *Chin. J. Anim. Nutr.*, 31(1): 437–443. [刘瀚扬, 吴永胜, 朱佳文, 陈亚迎, 徐麒麟, 许祯莹, 杨雪, 邱时秀, 齐桂兰, 李娟, 孙越鸿, 雷春龙, 2019. 蚯蚓提取物对小鼠生理效应的研究. *动物营养学报*, 31(1): 437–443]
- Liu JL, Yu JF, Wu JC, Yin JL, Wu DH, 2006. Insect reactive oxygen metabolism. *Chin. Bull. Entomol.*, 43(6): 752–756. [刘井兰, 于建飞, 吴进才, 印建莉, 吴东浩, 2006. 昆虫活性氧代谢. *昆虫知识*, 43(6): 752–756]
- Luo W, Deng ZH, Li R, Cheng G, Kotian RN, Li YS, Li WP, 2018. Study of analgesic effect of earthworm extract. *Biosci. Rep.*, 38(1): BSR20171554.
- Mi Z, Ruan CL, Li JR, Fu QJ, Wu JJ, Sendegaya P, Zhu Y, Gong J, 2013. Influence of sodium fluoride on MDA content and CAT activity in hemolymph of *Bombyx mori*. *J. Southwest Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 35(4): 1134–1141. [米智, 阮成龙, 李姣蓉, 付巧娟, 武娟洁, Sendegaya P, 朱勇, 龚竞, 2013. 氟化钠对家蚕血液丙二醛物质的量浓度和过氧化氢酶活性的影响. *西南大学学报(自然科学版)*, 35(4): 1134–1141]
- Omar HM, Ibraheim ZZ, Elshimy NA, Ali RS, 2012. Anti-inflammatory, antipyretic and antioxidant activities of the earthworms extract. *J. Biol. Earth Sci.*, 2(1): 10–17.
- Prakash M, Gunasekaran G, Elumalai K, 2008. Effect of earthworm powder on antioxidant enzymes in alcohol induced hepatotoxic rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol.*, 12(4): 237–243.
- Qin MH, Yue QQ, Wang WH, 1988. Preliminary report on the effect of increasing the yield of silkworms by the earthworm. *Newsl. Seric. Sci.*, (2): 25–29. [覃明和, 岳清泉, 王万和, 1988. 家蚕添食蚯蚓制剂增产效应研究初报. *蚕学通讯*, (2): 25–29]
- Sifi K, Soltani N, 2018. Seasonal changes of two biomarkers of oxidative stress (LDH, MDA) in the edible mollusc *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia) from the Gulf of Annaba (Algeria): correlation with carbohydrate and lipid contents. *Molluscan Res.*, 39(1): 44–52.
- Tang FF, Zheng YQ, Bai XR, Chen B, 2017. Change in the resistance to nucleopolyhedrovirus and the expression levels of the related antimicrobial peptide and heart shock protein genes in *Bombyx mori* exposed to short-time heat shock. *Acta Entomol. Sin.*, 60(5): 505–512. [唐芬芬, 郑亚强, 白兴荣, 陈斌, 2017. 短时热激后家蚕对核型多角体病毒的抗性及相关抗菌肽和热激蛋白基因表达水平的变化. *昆虫学报*, 60(5): 505–512]
- Wu SH, Li Z, Li HB, Li GL, 2015. Effect of *Semen cassiae* water extract on life-span of *Bombyx mori* L. based on the free-radical theory. *Chin. J. Gerontol.*, 35(15): 4110–4113. [吴宿慧, 李竹, 李寒冰, 李根林, 2015. 决明子对家蚕寿命的影响及机制. *中国老年学杂志*, 35(15): 4110–4113]
- Xiao LY, Cheng JL, Wang J, Wang CH, 2010. Change of lipid peroxide and antioxidant content and antioxidant enzymatic activity in hemolymph of fluoride poisoned *Bombyx mori* larvae. *Sci. Seric.*, 36(6): 169–173. [肖龙云, 程嘉翎, 王俊, 王春华, 2010. 家蚕氟化物中毒后血淋巴中脂质过氧化物和抗氧化物含量及抗氧化酶活性的变化. *蚕业科学*, 36(6): 169–173]
- Xie DS, Wu C, Kang YH, Huang K, 2008. Effect of earthworm extract on immune function of arbor acre. *Livestock Poult. Ind.*, (4): 8–10. [谢大识, 吴诚, 康映辉, 黄葵, 2008. 蚯蚓提取物对肉鸡免疫功能的影响研究. *畜禽业*, (4): 8–10]
- Xu QL, Wu YS, Zhu JW, Xu ZY, Qiu Z, Liu HY, Chen YY, Lei CL, Qiu SX, Li J, 2019. Effect of earthworm extract on growth performance, serum biochemical index, antioxidant capacity and immune function of Chenghua pigs. *China Feed*, (13): 42–46. [徐麒麟, 吴永胜, 朱佳文, 许祯莹, 邱钟, 刘瀚扬, 陈亚迎, 雷春龙, 邱时秀, 李娟, 2019. 蚯蚓提取物对成华猪生长性能、血清生化指标、抗氧化能力及免疫功能的影响. *中国饲料*, (13): 42–46]
- Yang JJ, Wang TT, Li Y, Yao WX, Ji XM, Wu QY, Han RH, Yan WW, Yuan JL, Ni CH, 2016. Earthworm extract attenuates silica-induced pulmonary fibrosis through Nrf2-dependent mechanisms. *Lab. Invest.*, 96: 1279–1300.
- Yuan HX, Chu F, Qin FJ, Liu J, He YQ, Liu H, 2014. Effect of cadmium exposure on the lipid peroxide content and the antioxidant enzyme activity and mRNA expression in the fat body in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 57(2): 168–175. [袁红霞, 褚峰, 秦粉菊, 刘佳, 何亚清, 刘航, 2014. 镉胁迫对家蚕脂肪体脂质过氧化物含量及抗氧化酶活性和 mRNA 表达的影响. *昆虫学报*, 57(2): 168–175]
- Zhou YJ, Li WP, 2009. Study on antioxidation of antioxidant extract from earthworm. *Prog. Veter. Med.*, 30(6): 58–62. [周亿金, 李文平, 2009. 蚯蚓抗氧化提取液抗氧化作用研究. *动物医学进展*, 30(6): 58–62]